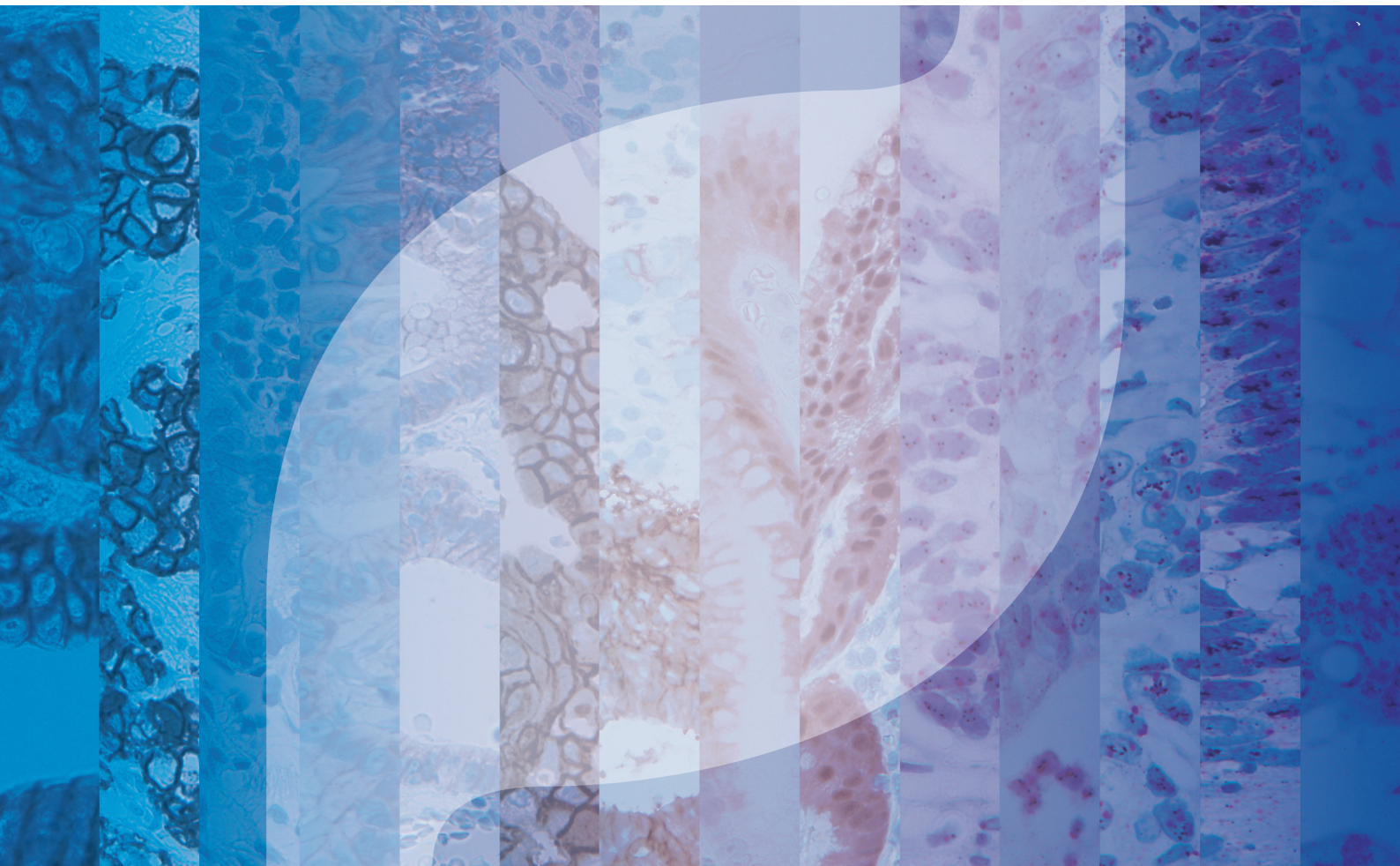
HER2検査ガイド―胃癌編―

ベンタナ I-VIEWパスウェーHER2 (4B5)　製造販売承認番号：22100AMX00667000
ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット　製造販売承認番号：22300AMX00002000



はじめに

現在、HER2に対する分子標的治療に先立って、その標的分子であるHER2のタンパク過剰発現および遺伝子増幅の検査が、治療対象である乳癌において実施されており、治療効果予測に欠かせない検査となっています。

国際共同第Ⅲ相臨床試験ToGA試験(B018255)において、HER2陽性進行・再発胃癌で、抗HER2ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(ハーセプチン；中外製薬)の併用により、全生存期間の有意な延長が示され[1)]、2010年1月にEU、10月に米国において「HER2陽性転移性胃癌または胃食道接合部癌」へのトラスツズマブの適応が承認されました。

2011年3月には、国内においてもトラスツズマブの「HER2過剰発現が確認された治療切除不能な進行・再発の胃癌または胃食道接合部癌」への追加適応が承認され、乳癌同様、胃癌におけるHER2のタンパク過剰発現および遺伝子増幅の検査が不可欠となりました[1)]。

■国際共同第Ⅲ相臨床試験ToGA試験(B018255)

ToGA試験は、HER2陽性の進行・再発胃癌患者に対して、標準的に行われている化学療法へのトラスツズマブの併用効果を評価することを目的に実施された、国際共同第Ⅲ相臨床試験です。

約3,800 名に対してHER2検査を実施し、HER2 陽性胃癌であることが確認された810名のうち、試験の適格基準を満たした584名が対象となりました。

5-FUまたはカペシタビン＋シスプラチンの化学療法単独群290例と、5-FUまたはカペシタビン＋シスプラチン＋トラスツズマブの併用群294例における全生存期間中央値は、化学療法単独群が11.1ヶ月、トラスツズマブ併用群が13.8ヶ月(ハザード比0.74, p=0.0046)であり、併用により有意な生存期間延長が確認されました。また、IHC法スコア2＋でFISH法陽性またはIHC法スコア3＋の症例では全生存期間中央値が16.0ヶ月と、生存期間の延長が示されたことから、HER2検査の有用性が示唆されました。

■HER2検査

ロシュ・ダイアグノスティックス(株)では、HER2のタンパク過剰発現の検査薬である**ベンタナ I-VIEW パスウェーHER2(4B5)**と、遺伝子増幅の検査薬である**ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット**が体外診断用医薬品を取得しています。

ベンタナI-VIEW パスウェーHER2(4B5)

ベンタナI-VIEWパスウェーHER2(4B5)は、Ventana Medical Systems社(ベンタナ社)製の自動染色装置用に開発され、HER2タンパクの過剰発現を免疫組織化学染色法(IHC法)により検出する検査キットです。染色の全工程が完全自動化されます。

Ⅰ.キットの構成

商品コード:518107918

構成試薬	成分	分量
一次抗体	抗HER2ウサギモノクローナル抗体(4B5)	5mL(50テスト)

*別売りのI-VIEW DAB ユニバーサルキット(商品コード:518100032)と一緒にご使用ください。

I-VIEW DABユニバーサルキット(別売り)*		250テスト
インヒビター	過酸化水素	25mL
ビオチン標識Ig	ビオチン標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体	25mL
アビジン-HRP	ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン	25mL
DAB試薬	3-3'-ジアミノベンジジン	25mL
H2O2試薬	過酸化水素	25mL
COPPER試薬	硫酸銅	25mL

■対応機種

- ベンタナGX-ベンチマークモジュール
- ベンタナXTシステムベンチマーク
- ベンタナベンチマークULTRA

■別途必要な器具および試薬等

- コーティングスライドガラス(推奨としては、ベンタナ:ISH/IHCスライド(商品コード:518103170)、松浪硝子:MAS-GPおよびプラチナ、武藤化学:New Silane Ⅲなどがあります)
- リアクションバッファー(商品コード:518103033)
- 液体カバースリップHI(商品コード:518100599)または液体カバースリップULTRA(商品コード:518108922)
- EZバッファー(商品コード:518102982)
- CC1バッファー(商品コード:518103002)またはCC1バッファー ULTRA(商品コード:518108939)
- ヘマトキシリン核染色試薬II(商品コード:518102319)等
- 炭酸リチウム試薬(商品コード:518100889)
- 内因性ビオチン/アビジンブロッキング試薬(商品コード:518100605)
- イムノブロック(DSファーマ社)、スキムミルク等、検体の前処理に必要な試薬
- 精度管理用コントロールスライド(HER2 4 in1コントロールスライド(商品コード:518107895)または自家製)
- キシレン、アルコール(脱水・透徹用)
- カバーガラス、封入剤
- 精製水または脱イオン水
- 光学顕微鏡
- スライドバーコードラベル(E-barラベルⅡ(商品コード:518103095))

Ⅱ. 試薬の調製方法

- 本キットはベンタナ社製の自動染色装置専用の試薬です。
- 各試薬はそのまま用いてください。
- 必要に応じて調製したバッファー類、液体カバースリップを自動染色装置に充填してください。

Ⅲ. スライド標本の準備

1 適切な方法により固定、包埋した検体を薄切し、シランなどがコートされたスライドガラスに貼り付けてください。

2 薄切後、検体スライドは約40℃で一晩乾燥させることが推奨されます。高温での短時間での乾燥は、60℃で30分間以内の処理に留め、長時間高温に置くことは避けてください。

3 自動染色装置用のバーコードが印字されたラベルを、検体スライドのフロスト部分に貼付してください。

Ⅳ. 測定(操作)方法

本キットは弊社の自動染色装置を用いて操作を行います。代表的な自動染色装置として「ベンタナXTシステム ベンチマーク」を使用した場合の全自動の操作方法は、以下の通りです。(詳しくは自動染色装置の取扱説明書を参照してください。)

1 装置のスイッチを入れ、Windowsの画面から装置のソフトウエアを立ち上げます。

2 装置の使用説明書に従って、プロトコールを作成し、ソフトウエアに保存してください。

ベンチマークXTにおける推奨の染色条件

染色操作	染色プロトコール
Deparaffinization (脱パラフィン)	Selected
Cell Conditioning (熱処理)	Selected CC1 std
Antibody (一次抗体)	37℃ 32 min
AB Block (内因性ビオチンのブロッキング)	Selected
Counterstain (核染色)	Hematoxylin II – 8 min
Post Counterstain (色出し)	Bluing Reagent – 4min

3 検体スライドを染色モジュールのスライドホルダーにセットします。

4 必要な試薬を装置にセットし、フロント・ドアを閉めてください。

5 メイン画面の RUN をクリックすると、試薬ディスペンサーキャップおよびストッパーが外されていることを確認する画面が表示されます。確認後、チェックボックスにチェックを入れ、検体スライドの枚数を入力し、START RUN をクリックします。

染色操作の進行時間あるいは終了予定時間が画面に表示され、染色処理が開始されます。

熱処理

一次抗体の抗原賦活処理として、推奨条件を参考に、自動免疫染色装置で熱処理を実施します。

一次抗体の反応および検出

(1) 検体スライド上の検体にインヒビターを1滴(約100uL)加え、4分間反応させます。

(2) 検体スライド上のインヒビターを洗浄後、一次抗体を1滴(約100uL)加え、32分間反応させます。

(3) 検体スライド上の一次抗体を洗浄後、ビオチン標識Igを1滴(約100uL)加え、8分間反応させます。

(4) 検体スライド上のビオチン標識Igを洗浄後、アビジンーHRPを1滴(約100uL)加え、8分間反応させます。

(5) 検体スライド上のアビジンーHRPを洗浄後、DAB試薬とH2O2試薬を1滴ずつ(約100uL)加え、8分間反応させます。

(6) 検体スライド上のDAB試薬とH2O2試薬を洗浄後、COPPER試薬を1滴(約100uL)加え、4分間反応させます。

(7) 検体スライド上のCOPPER試薬を洗浄後、自動免疫染色装置での染色工程が終了します。

対比染色

検出終了後、対比染色として核染色および色出しを実施します。

6 取り出し、封入

染色が終了したら、自動免疫染色装置から検体スライドを取り出し、水洗、脱水、透徹後、封入し、光学顕微鏡により鏡検を行います。

■ 操作上の注意

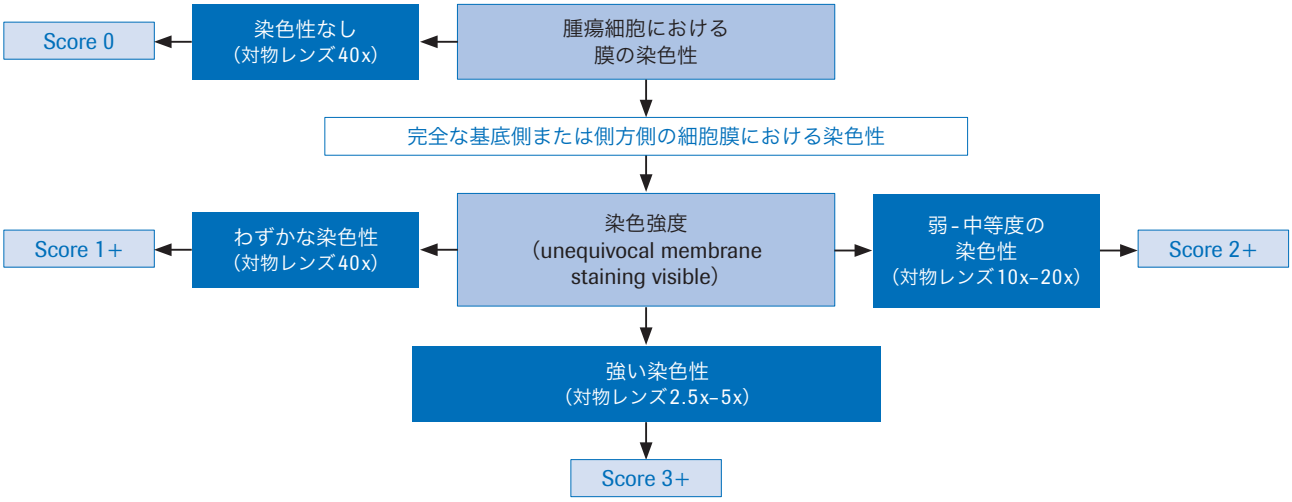
- 検体にはホルマリン固定パラフィン切片を使用してください。
- 固定液は10%中性緩衝ホルマリンの使用が推奨されます[2)]。
- 組織の固定時間は6時間以上48時間以内が推奨されます[2)]。
- 病理標本作製過程における不適切な操作(固定不良や過固定等)が染色不良の原因となりうることから、十分に注意してください。
- 検体となる組織切片は4umに薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付け、薄切後は速やかに染色を実施してください。また、使用するスライドガラスは、製造後なるべく新しいものを使用してください。
- 本キットは、既に適切な濃度に希釈されているので、希釈せずにそのまま使用してください。希釈して使用すると十分な染色結果が得られないことがあります。
- 染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認してください。

V. 染色結果の判定

■胃癌におけるスコアリングの判定フローチャート

以下のフローチャートに従って判定します。

光学顕微鏡の2-4倍対物レンズを使用して、腫瘍全体における細胞膜の染色性を確認してください。次に10-20倍対物レンズで細胞膜への染色強度を評価します。必要に応じて、40倍対物レンズで確認してください。

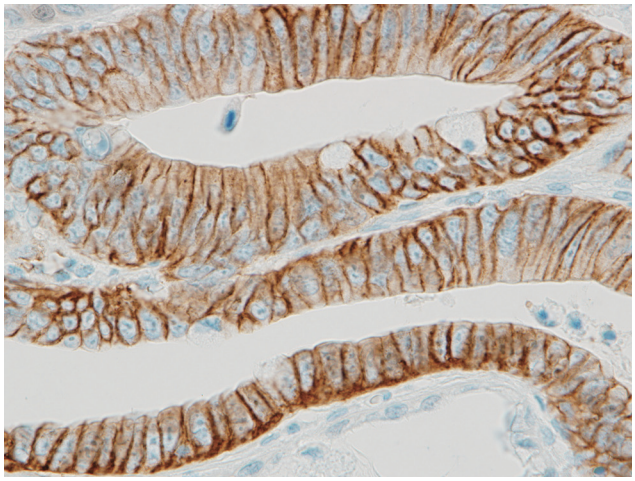


■胃癌におけるスコアリングの判定基準

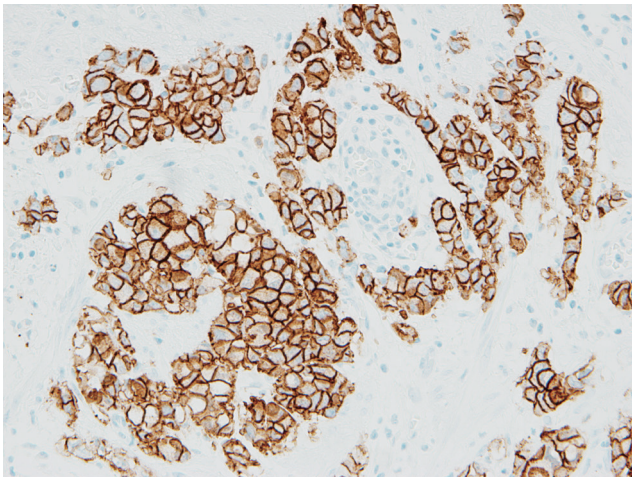
細胞膜における特異的反応を判定対象とします。乳癌とは異なり、全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合もあります。

Score	切除標本の染色パターン	生検標本の染色パターン	HER2　過剰発現
0	細胞膜に陽性染色なし あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が 一切片上に10%未満	陽性染色なし あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞なし	陰性
1+	弱／ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の 染色性がある腫瘍細胞が一切片上に10%以上 腫瘍細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 弱／ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の 陽性染色がある腫瘍細胞クラスター （5個以上の集塊）	陰性
2+	弱-中程度の完全な側方または側方・基底膜側の 細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が 一切片上に10%以上	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 弱-中程度の完全な側方または側方・基底膜側の 細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞クラスター （5個以上の集塊）	境界域 （Equivocal）
3+	強い完全な側方または側方・基底膜側の 細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が 一切片上に10%以上 全周性に認められない場合もある	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 強い完全な側方または側方・基底膜側の 細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞クラスター （5個以上の集塊）	陽性

■胃癌におけるHER2タンパクの代表的な染色例

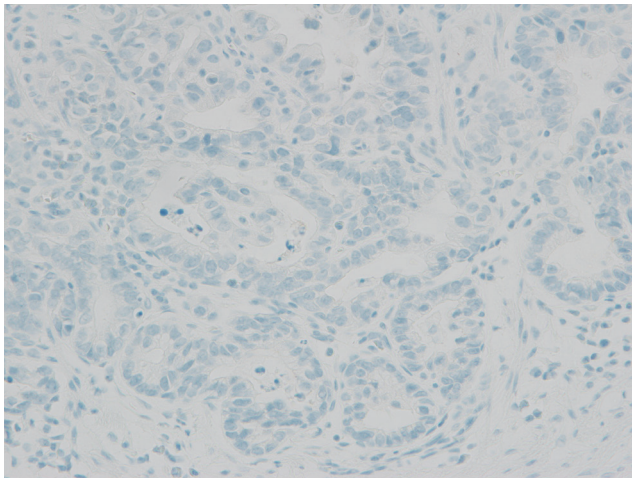


完全な側方または側方・基底膜側の細胞膜への陽性反応を認める

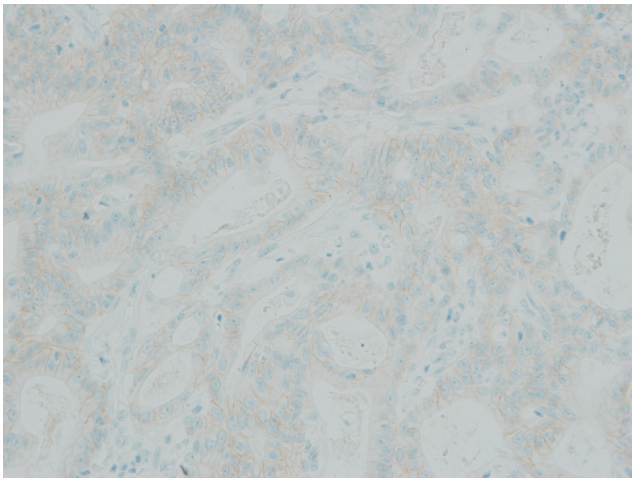


乳癌同様、細胞膜に全周性の陽性反応を認める

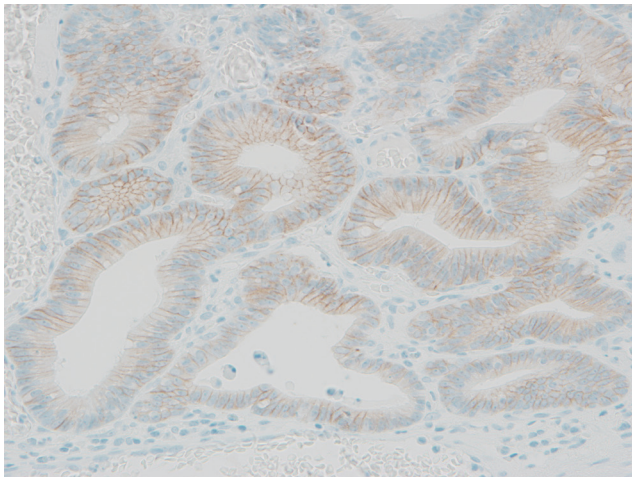
■胃癌におけるHER2タンパクの代表的な染色例



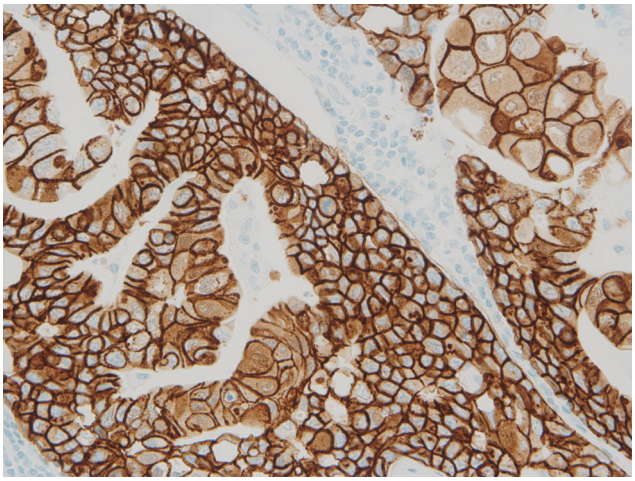
Score 0



Score 1+



Score 2+

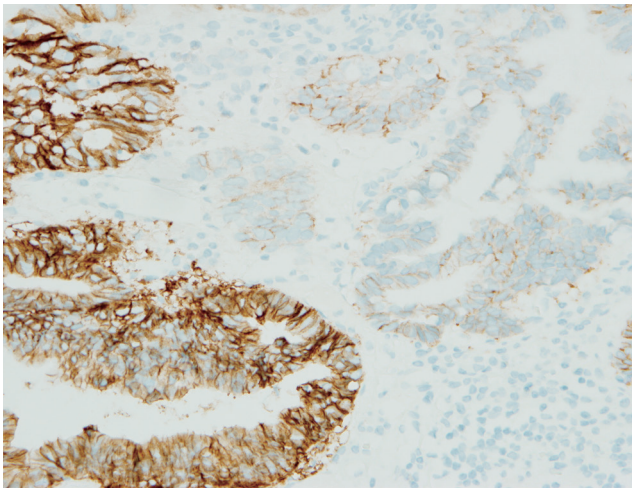


Score 3+

■判定上の注意

- **腫瘍内の不均一性（Heterogeneity）**

  しばしば、腫瘍においてHER2タンパク過剰発現の不均一性が認められ、判定においては、腫瘍全体を観察することが重要となってきます。

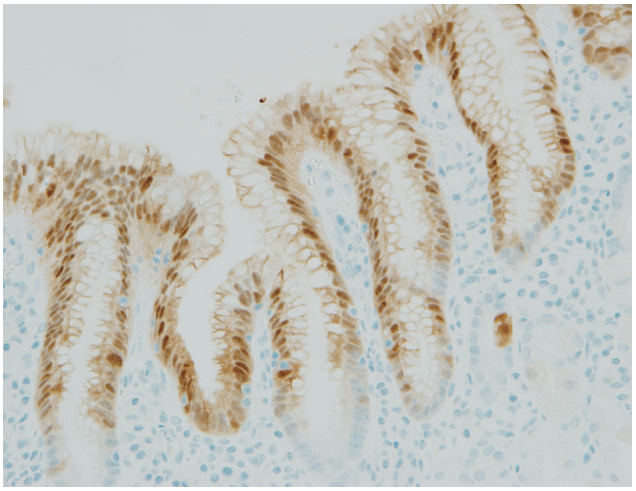


- **発現状況および判定対象**

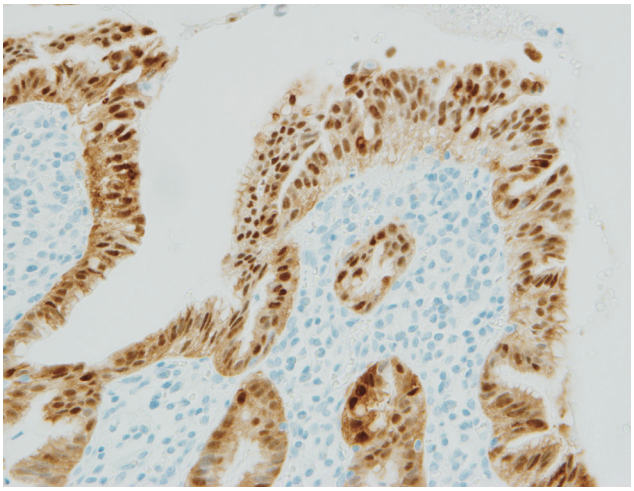
  腫瘍腺管の管腔側にはHER2受容体は存在せず、通常は染色されないため、管腔側のみに限局した染色性については、判定対象外となります。

- **HER2（4B5）の交差性について**

  正常および腫瘍組織の一部の核および細胞質に交差性反応を認めます。胃癌におけるHER2の判定は腫瘍細胞の膜における反応性が対象となりますので、これらの反応性は判定対象外となります。



正常上皮細胞の細胞質および核における反応

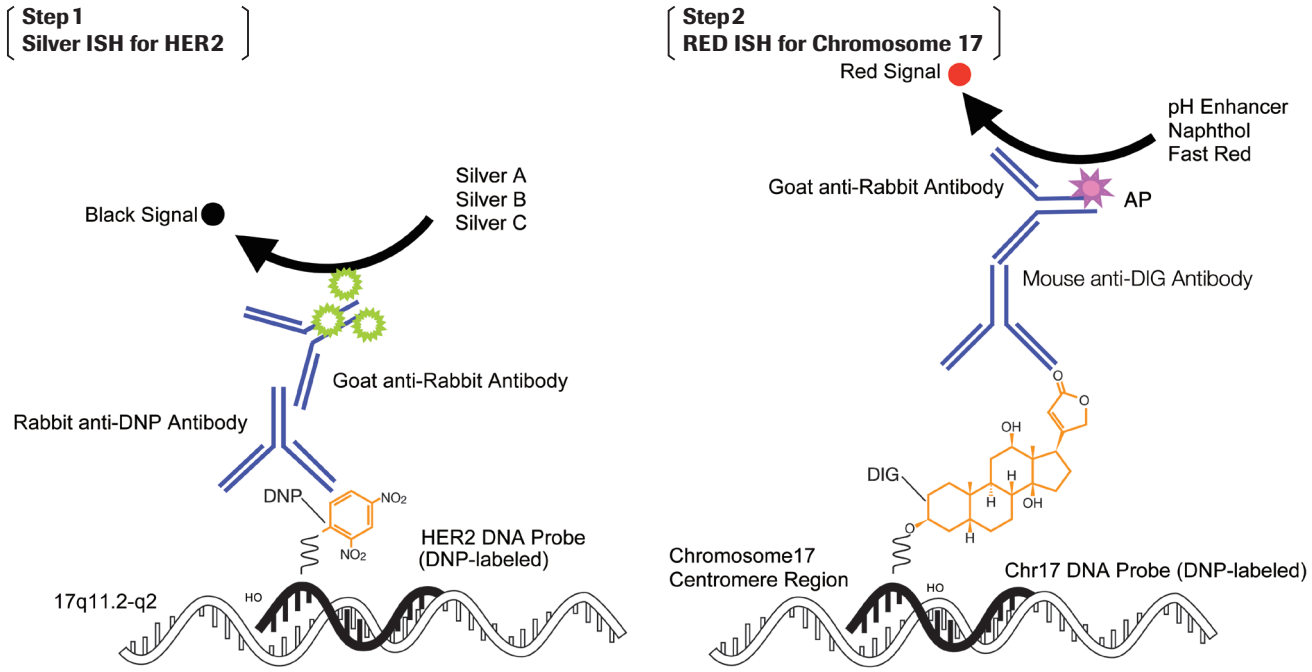


腫瘍細胞の細胞質および核における反応

ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット

ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キットは、独自の技術であるSilver *in situ* Hybridization法(SISH法)をベースとしたDual Color *in situ* Hybridization法(DISH法)により、腫瘍組織中のHER2遺伝子およびHER2遺伝子が局在する第17番染色体を、黒色(HER2遺伝子)と赤色(第17番染色体)のシグナルとしてそれぞれ検出します。検出されたシグナルは光学顕微鏡下で観察が可能であり、腫瘍組織の形態学的特徴との同時観察を実現しました。

■反応原理(模式図)



標本上のHER2遺伝子および第17番染色体のセントロメアにジニトロフェノール(DNP)標識HER2 DNAプローブとジゴキシゲニン(DIG)標識Chromosome 17 DNA プローブとのカクテルプローブを同時にハイブリダイゼーションさせます。次に、抗DNP 抗体とペルオキシダーゼ(HRP)標識抗体を反応させると、標本上にDNP標識HER2 DNAプローブー抗DNP ウサギモノクローナル抗体ーHRP標識抗ウサギIgヤギ ポリクローナル抗体の結合物が形成されます。この結合物のHRPに酢酸銀(発色試薬A)、ハイドロキノン(発色試薬B)を過酸化水素(発色試薬C)とともに添加すると、酵素反応により標本上のHER2が黒色に染色されます。続いて、抗DIG抗体とアルカリフォスファターゼ(AP)標識抗体を反応させると、DIG標識Chr17 DNA プローブー抗DIG マウスモノクローナル抗体ーAP標識抗マウスIg ヤギポリクローナル抗体の結合物が形成されます。この結合物のAPに、ナフトールAS-TR(Naphthol試薬)、ファーストレッドKL塩(Fast Red試薬)を塩化マグネシウム(pHエンハンサー試薬)とともに添加すると、酵素反応により、標本上のChr17が赤色に染色されます。

■従来法との相関

本法と従来法であるFISH法との相関性を検討したところ、乳癌組織132例において98.5%の一致率となり、良好な相関性が得られています。

		FISH法		計
		増幅なし	増幅あり	
SISH法	増幅なし	65例	1例	66例
	増幅あり	1例	65例	66例
計		66例	66例	132例

Ⅰ.キットの構成

商品コード：518109509

構成試薬	成分	分量
HER2 DNA カクテル　プローブ	1)ジニトロフェノール標識　HER2 DNA プローブ （HER2 プローブ） 2)ジゴキシゲニン標識　Chr17 DNA プローブ （Chr 17 プローブ）	10mL（50テスト）

*別売りの*ultra*View SISH DNP キット（商品コード：518109516）および
*ultra*View Red ISH DIG キット（商品コード：518109523）と一緒にご使用ください。

*ultra*View SISH DNP キット（別売り）*		100テスト
抗DNP抗体	抗ジニトロフェノール　ウサギモノクローナル抗体	10mL
抗ジニトロフェノール ウサギモノクローナル抗体	ペルオキシダーゼ標識 抗ウサギIg　ヤギポリクローナル抗体	10mL
発色試薬A	酢酸銀	20mL
発色試薬B	ハイドロキノン	10mL
発色試薬C	過酸化水素	10mL

*ultra*View ISH DIG キット（別売り）*		100テスト
抗DIG抗体	抗ジゴキシゲニン　マウスモノクローナル抗体	10mL
AP標識抗体	アルカリフォスファターゼ標識　抗マウスIg ヤギポリクローナル抗体	10mL
pHエンハンサー試薬	塩化マグネシウム	20mL
Naphthol試薬	ナフトールAS-TR	10mL
Fast Red試薬	ファーストレッドKL塩	20mL

■対応機種

- ベンタナGX-ベンチマークモジュール
- ベンタナXTシステムベンチマーク
- ベンタナベンチマークULTRA

■別途必要な器具および試薬等

- コーティングスライドガラス（推奨としては、ベンタナ：ISH/IHCスライド（商品コード：518103170）、松浪硝子：MAS-GPおよびプラチナ、武藤化学：New Silane Ⅲなどがあります。）
- ハイブレディ
- ISH プロテアーゼ 2（商品コード：518102272）またはISH プロテアーゼ 3（商品コード：518102289）
- リアクションバッファー（商品コード：518103033）
- 液体カバースリップHI（商品コード：518100599）または液体カバースリップULTRA（商品コード：518108922）
- EZバッファー（商品コード：518102982）
- *ultra*View Silver Wash II バッファー（商品コード：518108892）
- SSC バッファー（商品コード：518103026）
- CC2バッファー（商品コード：518102999）またはCC2バッファー ULTRA（商品コード：518108946）
- ヘマトキシリン核染色試薬II（商品コード：518102319）等
- 炭酸リチウム試薬（商品コード：518100889）
- 精度管理用コントロールスライド（HER2 Dual ISH 3 in 1コントロール スライド（商品コード：518109530）または自家製）
- キシレン（透徹用）
- カバーガラス、封入剤
- 精製水または脱イオン水
- 光学顕微鏡
- スライドバーコードラベル（E-barラベルⅡ（商品コード：518103095）

Ⅱ. 試薬の調製方法

- 本キットはベンタナ社製の自動染色装置専用の試薬です。
- 各試薬はそのまま用いてください。
- 必要に応じて調製したバッファー類、液体カバースリップ、*ultra*View Silver Wash II バッファーを自動染色装置に充填してください。

Ⅲ. 機器の整備

本キットの導入にあたり、機器の整備を行っていただく必要があります。詳細については、弊社カスタマーサポートセンター（フリーダイアル：0120-868-555）へお問い合わせください。

- **廃液センサーの交換（ベンタナ XT システムベンチマークのみ）**
  本キットを用いて染色を行った場合、従来の染色に比較して廃液量が多いため、本キット用に改良された廃液センサーへの交換が必要となります。
- **レベル 1 チェック**
  弊社 FSE により機器の調整を行います。
- **デコンタミネーション実施**
  安定した染色性を維持するために、バッファータンクおよび流路ラインの洗浄をしてください。その後、3ヶ月毎の実施を推奨します。
- **オプションタンクへの*ultra*View Silver Wash II バッファーの充填**
  本キット専用の*ultra*View Silver Wash II バッファーをオプションタンクに充填してください。

Ⅳ. スライド標本の準備

1. 適切な方法により固定、包埋した検体を薄切し、シランなどがコートされたスライドガラスに貼り付けてください。
2. 薄切後、検体スライドは約 40℃で一晩乾燥させることが推奨されます。高温での短時間での乾燥は、60℃で 30 分間以内の処理に留め、長時間高温に置くことは避けてください。
3. 自動染色装置用のバーコードが印字されたラベルを、検体スライドのフロスト部分に貼付してください。

V. 測定(操作)方法

本キットは弊社の自動染色装置を用いて操作を行います。代表的な自動染色装置として「ベンタナXTシステム ベンチマーク」を使用した場合の全自動の操作方法は、以下の通りです。(詳しくは自動染色装置の取扱説明書を参照してください。)

1 装置のスイッチを入れ、Windowsの画面から装置のソフトウエアを立ち上げます。

2 装置の使用説明書に従って、プロトコールを作成し、ソフトウエアに保存してください。プロトコール作成にあたっては、検体毎に至適染色条件を選定することが推奨されます。参考として、「ベンタナXTシステム ベンチマーク」を使用した場合の染色条件の設定範囲および推奨の染色条件を示します。

ベンチマークXTにおける条件設定範囲(選択可能な項目のみ表示)

染色操作	使用試薬	反応温度および時間 *1	染色に与える影響
Deparaffinization (脱パラフィン)	——	Depar または Extended Depara	Extended Deparaにすることにより、脱パラフィン不良を軽減
Cell Conditioning (熱処理)	Cell Conditioning CC2 または Cell Conditioning RB*2	Mild: 8-16 min Standard: 8-16 min Extended: 8-16 min	処理時間の延長はシグナル強度を増強、処理時間および処理サイクルの短縮はシグナル強度を減弱
ISH Protease (酵素処理)	ISH-Protease 2 または ISH-Protease 3	4-32 min	処理時間の延長はシグナル強度を増強させるが、組織および形態への影響も大きくなる
Denaturation (熱変性)	——	12-32 min	処理時間の延長はシグナル強度を増強させるが、バックグラウンドへの影響も大きくなる
Hybridization (ハイブリダイゼーション)	——	1-12 hour	処理時間の延長はシグナル強度を増強させるが、染色途中のスライド乾燥の原因の一つとなることがある
Stringency wash Temperature (プローブの洗浄温度)	——	72/74/76℃	76℃にすることで非特異的シグナルを軽減させることができる
SISH Multimer SISH Chromogen	—— ——	12-60 min 4-12 min	処理時間の延長はシグナル強度を増強させるが、バックグラウンドへの影響も大きくなる
Red Multimer Red Chromogen	—— ——	12-60 min 4-12 min	処理時間の延長はシグナル強度を増強させるが、バックグラウンドへの影響も大きくなる
Counterstain (核染色)	Hematoxylin II	4-32 min	処理時間の延長は核への染色性を増強させる
Post Counterstain (色出し)	Bluing Reagent	4-32 min	処理時間の延長は核への染色性を増強させる

*1：反応時間は、4分ごとに選択可能
*2：Cell Conditioning RBを選択時は、熱処理溶液として、リアクションバッファーを使用

手術材料における染色条件の一例

染色操作	染色プロトコール
Deparaffinization （脱パラフィン）	Extended Deparaffinization
Cell Conditioning （熱処理）	Selected Mild CC2 – 12 min Standard CC2 – 12 min Extended CC2 – 12 min
ISH Protease （酵素処理）	ISH Protease 3 16 min
Denaturation （熱変性）	20 min
Hybridization （ハイブリダイゼーション）	6 hours
Stringency wash Temperature （プローブの洗浄温度）	72℃
SISH Multimer	24 min
SISH Chromogen	8 min
Red Multimer	32 min
Red Chromogen	12 min
Counterstain （核染色）	Hematoxylin II – 8 min
Post Counterstain （色出し）	Bluing Reagent – 4min

生検材料における染色条件の一例

染色操作	染色プロトコール
Deparaffinization （脱パラフィン）	Deparaffinization
Cell Conditioning （熱処理）	Selected Mild CC2 – 12 min Standard CC2 – 12 min Extended CC2 – 12 min
ISH Protease （酵素処理）	ISH Protease 3 8 min
Denaturation （熱変性）	20 min
Hybridization （ハイブリダイゼーション）	6 hours
Stringency wash Temperature （プローブの洗浄温度）	72℃
SISH Multimer	16 min
SISH Chromogen	4 min
Red Multimer	32 min
Red Chromogen	12 min
Counterstain （核染色）	Hematoxylin II – 8 min
Post Counterstain （色出し）	Bluing Reagent – 4min

3 検体スライドを染色モジュールのスライドホルダーにセットします。

4 必要な試薬を装置にセットし、フロント・ドアを閉めてください。

5 メイン画面の RUN をクリックすると、試薬ディスペンサーキャップおよびストッパーが外されていることを確認する画面が表示されます。確認後、チェックボックスにチェックを入れ、検体スライドの枚数を入力し、START RUN をクリックします。

染色操作の進行時間あるいは終了予定時間が画面に表示され、染色処理が開始されます。

熱処理および酵素処理

プローブのハイブリダイゼーションの前処理として、推奨条件を参考に、自動染色装置で熱処理および酵素処理を実施します。

プローブのハイブリダイゼーションおよび検出

(1)スライドガラス上の検体にHER2 DNA カクテルプローブ2滴(約200uL)が滴下され、6時間反応されます。

(2)スライドガラス上のHER2 DNA カクテルプローブを洗浄後、抗DNP抗体1滴(約100uL)が滴下され、20分間反応されます。

(3)スライドガラス上の抗DNP抗体を洗浄後、HRP標識抗体1滴(約100uL)が滴下され、16分間反応されます。

(4)スライドガラス上のHRP標識抗体を洗浄後、発色試薬A 2滴(約200uL)に発色試薬Bと発色試薬Cが1滴ずつ(約100uL)滴下され、4分間反応されます。

(5)スライドガラス上の発色試薬A、発色試薬Bと発色試薬Cを洗浄後、抗DIG抗体1滴(約100uL)が滴下され、20分間反応されます。

(6)スライドガラス上の抗DIG抗体を洗浄後、AP標識抗体1滴(約100uL)が滴下され、24分間反応されます

(7)スライドガラス上のAP標識抗体を洗浄後、pHエンハンサー試薬2滴(約200uL)にNaphthol試薬1滴(約100uL)とFast Red試薬2滴(約200uL)が滴下され、8分間反応されます。

対比染色

検出終了後、対比染色として核染色および色出しを実施します。

6 取り出し、封入

染色が終了したら、自動免疫装置から検体スライドを取り出し、検体スライドを中性洗剤の溶液中で洗浄、精製水または脱イオン水で1分間程度、水洗します。その後、40-60℃に10分間から1時間以内放置もしくは室温放置し、完全に乾燥させます。乾燥後、キシレンに素早く浸漬(30秒以内)、封入します。

■操作上の注意

- ベンタナI-VIEWパスウェーHER2(4B5)の項(P.4)に準じてください。
- 使用する封入剤によって、シグナルの退色等を生ずる場合があります。

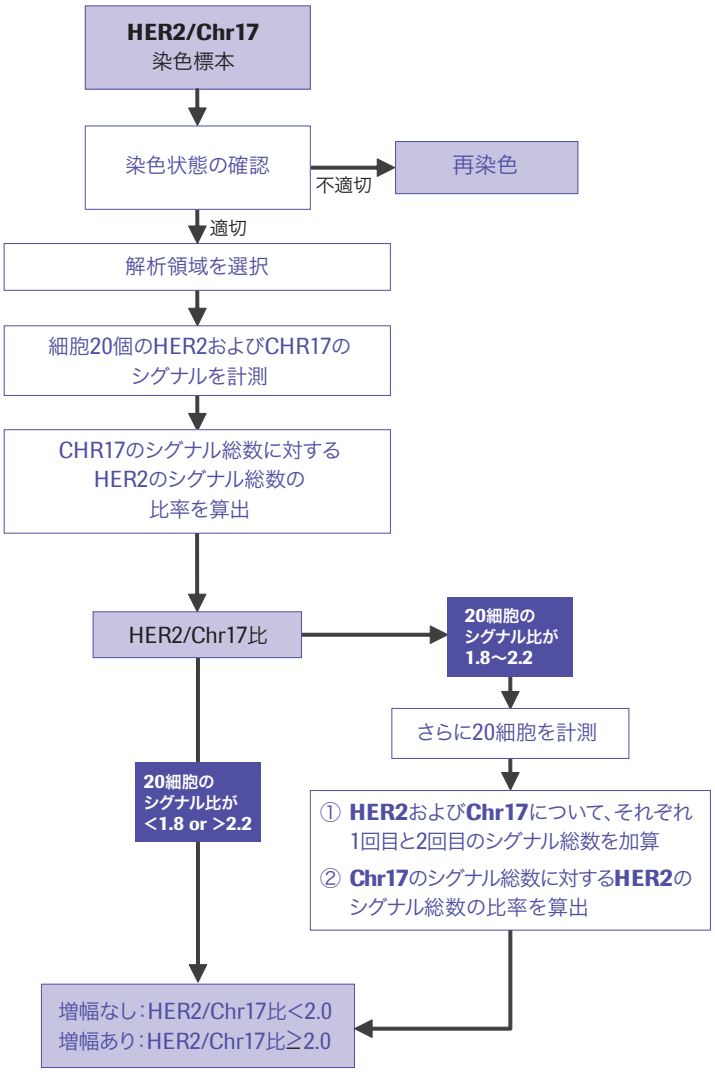
  推奨封入剤：DPX(メルク社)

  退色を生じる可能性のある封入剤：マリノール、エンテランニューなど

Ⅵ. 染色結果の判定

■胃癌におけシグナル計測のフローチャート

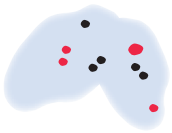
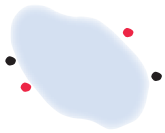
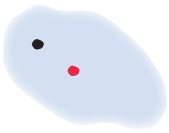
切除標本および生検標本において、IHCスコア2+症例が対象となります。IHCで陽性を示した領域で20個の腫瘍細胞を観察し、Chr17(赤色)のシグナル総数に対するHER2(黒色)のシグナル総数の比を算出します。シグナル比が2.0以上を増幅あり、2.0未満を増幅なしと判定します。ただし、シグナル比が1.8-2.2のものに関しては、さらに20細胞のシグナルを追加で計測し、合計40細胞でのシグナル比を算出します。

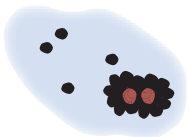
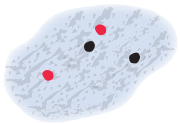
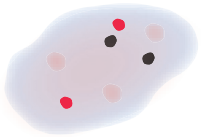


■胃癌におけるスコアリングの判定基準

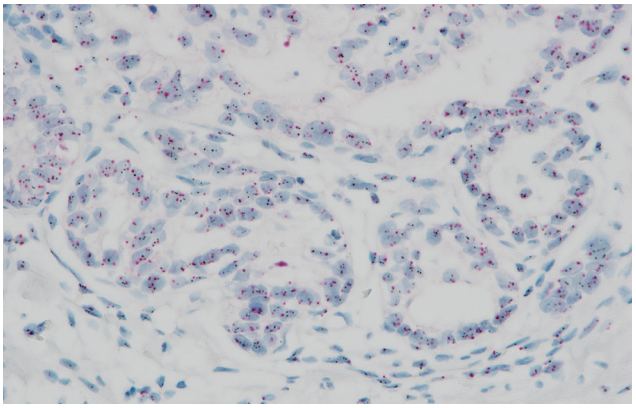
はじめに、精度管理用コントロールスライドおよび検体スライドの染色状態を確認します。適切に染色されていることを確認後、検体スライドにおける腫瘍細胞のHER2およびChr17のシグナルを計測してください。不適切な染色結果が認められた検体スライドについては、再度、染色を実施してください。

- 管理検体および検体スライドの染色性の確認
  自家製の管理検体または検体スライド内の正常細胞(間質線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球、非腫瘍の乳腺上皮細胞など)が、適切に染色されている場合、各細胞1-2コピーのHER2およびChr17のシグナルが認められます。
- シグナルの計測
  20X、40Xまたは60Xの対物レンズを使用して、個々の細胞の核について、HER2のシグナル数とChr17のシグナル数を数えて、記録します。複数のシグナルがクラスターを形成している場合、小さいクラスターはシグナル6個に、大きいクラスターはシグナル12個に数えます。詳細はシグナルの計測方法を参照してください。

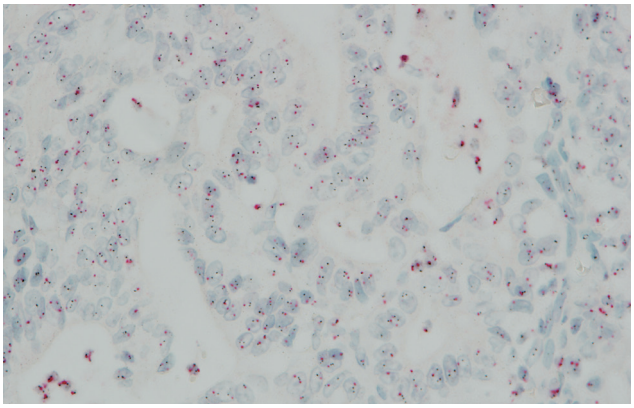
	核が重なっている細胞は計測対象から外す。
	シグナルの認められない細胞は計測対象から外す。
	二色のシグナルが認められない細胞は計測対象から外す。
	シグナルが核の外に認められる細胞は対象から外す。
	黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを1個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルを2個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。同色の2個のシグナルが、シグナルの直径と同じ距離、または直径よりも短い距離に位置する場合は、1個のシグナルとして数える。

	複数のシグナルのクラスターは正常細胞のシグナル1個の大きさを基準にシグナル数を決定する。この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは小さいクラスター1個でシグナル6個、単独のシグナルが2個、あわせて8個に、赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。**計測結果にクラスターを認めたことを記録する。**
	この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは大きいクラスターが1個でシグナル12個、単独のシグナルを4個、あわせて16個、赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。**計測結果にクラスターを認めたことを記録する。**
	二色のシグナルが接近して認められる場合には、対物60Xのレンズで確認して、黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを1個に数える。 この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを4個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルのクラスターに重なって、不鮮明な赤色(Chr17)のシグナルを認める場合、対物60Xのレンズで赤色(Chr17)のシグナルを確認する。
	核内に黒色のダスト状のバックグランドを認めた場合、明らかにシグナルと確認できるもののみを数える。
	シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合、シグナルとの鑑別に注意が必要であり、染色強度の違いで鑑別する。 この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを2個と赤色(Chr17)のシグナルを2個とする。

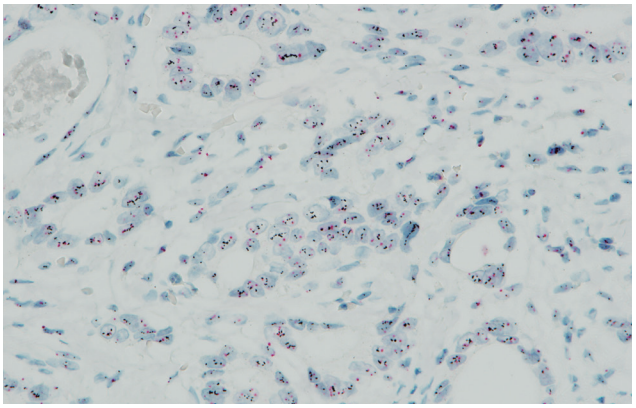
■増幅あり／なしの判定例



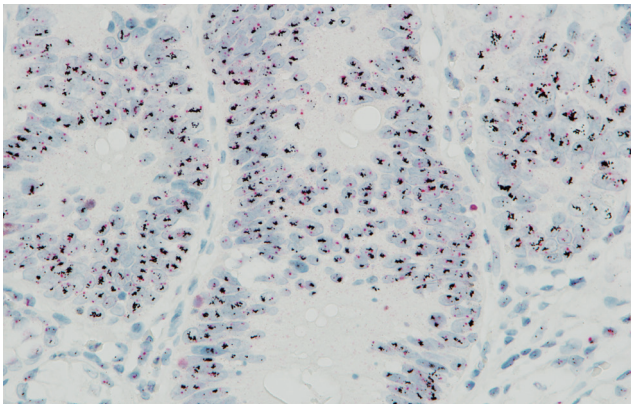
増幅なし
シグナル比　1.1



増幅なし
シグナル比　1.3



増幅あり（中等度）
シグナル比　3.2

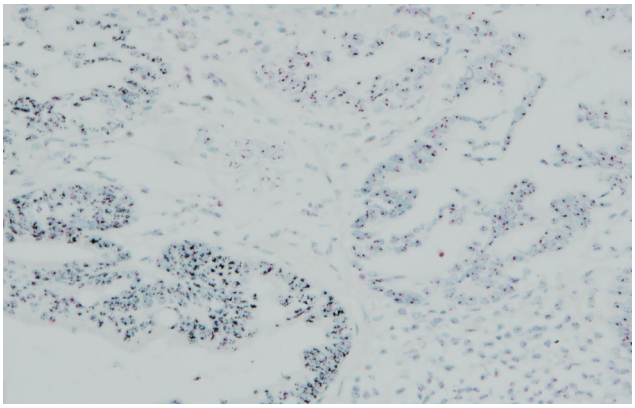


増幅あり（高度）
シグナル比　10.3

■判定上の注意

- **不均一性（Heterogeneity）**

胃癌ではHER2タンパクと同様に、腫瘍においてHER2遺伝子の不均一性が認められることが多くあります。そのため、染色結果の観察においては、腫瘍全体を観察することが重要となってきます。同一標本上で不均一性が認められた場合には、全体を低倍で観察後、増幅の高い部分を選択して、シグナルの計測を行ってください。



■参考文献

1) Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al:Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010 Aug 28;376(9742):687-97.

2) HER2検査ガイド, 第三版2009年9月トラスツズマブ病理部会作成

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
http://www.roche-td.jp/
カスタマーサポートセンター 0120-868-555

「Ventana」は、ロシュ社の登録商標です。

1014.TD.MCI.3000.HER2 01-001A